

## ネオカルチノスタチンの作用機作

著者	大槻 健蔵
号	768
発行年	1974
その他のタイトル	1. ネオカルチノスタチンによるHeLaS3細胞のDNA分解/2. ネオカルチノスタチンによる枯草菌のDNA分解機
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/19077">http://hdl.handle.net/10097/19077</a>

氏 名 ( 本 籍 )                      おお                      つき                      けん                      ぞう  
大                      槻                      健                      蔵

学 位 の 種 類                      医                      学                      博                      士

学 位 記 番 号                      医 博 第                      7 6 8                      号

学位授与年月日                      昭 和   4 9   年   3   月   2 6   日

学位授与の要件                      学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専門課程                      東北大学大学院医学研究科  
( 博士課程 ) 病理学系専攻

学位論文題目                      The mode of the action of Neocarzinostatin  
( ネオカルチノスタチンの作用機作 )  
1. Neocarzinostatin induced breakdown of  
DNA in HeLa S<sub>3</sub> cells  
( ネオカルチノスタチンによる HeLa S<sub>3</sub> 細胞の DNA 分解 )  
2. Mechanism of DNA degradation induced by Neocarzinostatin in Bacillus subtilis  
( ネオカルチノスタチンによる枯草菌の DNA 分解機構 )

( 主 査 )

論文審査委員 教授 石 田 名 香 雄   教授 佐 藤 正 二 郎

教授 山 根                      績

## 論文内容要旨

〔研究目的〕細菌細胞や動物細胞の増殖および生体高分子の生合成に特異的に作用する生理活性物質の作用機序を解明することは、その物質の生物学的な特性を明らかにするのみならず、細胞の生化学的な代謝機構の解析のため非常に貢献すると思われる。本研究は、このような立場で、土壌中の一放線菌の培養液より得られたアミノ酸18種、115個よりなる分子量11,000の酸性単純蛋白質ネオカルチノスタチン(NCS)の作用機序、特にDNA分解作用について解析することを目的とした。〔実験方法および実験結果〕(1) あらかじめ $^3\text{H}$ -サイミジンでラベルした対数増殖期の枯草菌 $10^8$  cells/ml (TSB培地)に、DNA合成を完全に阻害する20倍濃度のNCS( $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ )を添加すると、約15分からNCSの処理時間に応じて、10% TCA不溶性分画のDNAが、酸可溶性分子に分解することを認めた。(2) 枯草菌DNAは、分子量約 $3 \times 10^9$ ダルトンからなる高分子物質であるが、このような高分子がNCS処理によって、どのような段階をへて酸可溶性分子に分解されるのかをMcgrath等の方法で検討した。即ち、あらかじめ $^3\text{H}$ -サイミジンでラベルした枯草菌にNCS( $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ )を添加し、径時的に細胞を良く洗滌してから、リゾチームおよびラウリル硫酸ナトリウム(最終濃度0.4%)で細胞を処理した後、lysateを5-20% (W/V) 中性およびアルカリ蔗糖密度勾配遠心法で分析した。まず中性条件では、無処理対照のDNAの沈降パターンの主ピークが50sを示すのに対し(大腸菌のリボゾームRNAの沈降係数と比較して)、NCS処理90分での沈降パターンでは、この50sの主ピーク以外に、軽い方にもう1つのピークが認められ、約30sの沈降係数を示した。さらに、NCSを120分および150分間処理すると、50sの放射活性が減少するにつれて、30sのそれが相対的に増加することから、DNAが2本鎖で一定のsizeに規則的に切断されることが示唆された。アルカリ条件では、中性条件で分解が認められないような短時間、即ちNCS処理30分で、対照DNAの沈降パターンより軽い方にパターンの移行が認められ、DNAの1本鎖切断が、2本鎖のそれよりも早い時期に起ることを認めた。しかもこの1本鎖切断は、NCSの処理時間を90分、120分と長くしても、DNAの沈降パターンの主ピークの位置が変化せず、またこのピークの位置より軽い方にピークが認められないことから、1本鎖で切断されたDNAも一定のsizeであることが示唆された。(3) NCS処理によって誘起されるこのようなDNA分解は、DNA分子上のある特定部位からだけ起るのか、あるいはまたDNA分子上どの部位からでも不規則におこるものかどうかを次のような方法で検討した。即ち、枯草菌を $^{14}\text{C}$ -サイミジンで5分間ラベルした後、細胞を良く洗滌し新鮮な培地(TSB)で、 $35^\circ\text{C}$ 、15分間培養した後、 $^3\text{H}$ -サイミジンで5分間ラベルした。このようにして得た2重標識DNAがNCS処理によって、それぞれがどのように分解されるかを

検討した。その結果、 $^3\text{H}$ でラベルされたいわゆる新生 DNA 部位が、 $^{14}\text{C}$ でラベルされたそれよりもより選択的に分解されることを認めた。さらにこの事実を確認するために、枯草菌を $^3\text{H}$ -サイミジンで5分間ラベルした後、細胞を良く洗滌してから、新鮮な培地 (TSB) で、 $37^\circ\text{C}$  0分、5分、30分および45分間培養後に、それぞれに NCS ( $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) を添加し、60分後に $^3\text{H}$ でラベルされた DNA がどのように分解されるかを調べた。予期されたように、培養時間が長くなるに従って NCS 処理によって分解される $^3\text{H}$ でラベルされた DNA の量が減少することを認めた。従って、これらの実験結果は、DNA 合成点に近い新生 DNA がより選択的に分解されることを示唆している。(4) DNA 合成起点および DNA 合成点でクロモゾームが、細胞膜と結合しているとされている枯草菌において、NCS 処理によって DNA 合成点付近の DNA が選択的に分解するなら NCS がこの結合に何んらかの影響を及ぼすことが考えられる。そこで Earhart 等の M-band 法によってこの可能性を検討した。即ち、あらかじめ $^3\text{H}$ -サイミジンでラベルした枯草菌を NCS ( $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) で、5分、20分および40分間処理した後、リゾチーム処理、さらにサルコシネート (0.1%) で細胞を溶解してから、マグネシウムアセテートを終濃度  $10\text{ mM}$  になるように注意深く加え、細胞膜および DNA と結晶状のサルコシネートとの複合体を作り、そのものを 15-45% (W/V) 蔗糖密度勾配遠心法で分析した。この方法によって、DNA の 90% 以上を細胞膜との複合体として、蔗糖 30% の部位に 1 つの band として回収することが出来る。この方法での分析の結果、NCS 処理 5 分では、対照との差異を認められなかった。しかし NCS 20 分および 40 分の処理では、M-band に回収される DNA は、それぞれ対照と比較して、60% および 7% であった。この M-band に回収されないで軽い分画にくる DNA を透析の後、同一遠心条件でさらに長時間遠心すると、重い方に沈降することから、この DNA は高分子 DNA であることが判った。従ってこれらの事実から、NCS 処理によって、DNA を細胞膜との結合が切れ、DNA が遊離することを示唆している。〔結論〕以上の実験結果より、NCS によって誘起される枯草菌 DNA の分解の機序は、次のように要約される。即ち、NCS 処理によって、対数増殖期の枯草菌 DNA は、DNA 合成点付近の新生 DNA が分解される結果、NCS 添加 20 分以内に細胞膜との結合が切れ、細胞質内に遊離する。さらにこの DNA は、細胞内 Endonuclease によって、NCS 添加後 30 分以内に 1 本鎖で、90 分以内には 2 本鎖で、しかもそれぞれ一定の size に切断される。このようにして切断された DNA fragment は、さらに exonuclease によって酸可溶性分子に分解される。このような一連の DNA 分解過程を明らかにした。

## 審 査 結 果 の 要 旨

分子量 11,000 の酸性たん白で著明な制癌効果を示すネオカルチンスタチン (NCS) の作用機作を枯草菌を用いて追跡し、次の結果を得た。

即ち 50 mcg/ml の NCS は枯草菌 DNA の分解を惹起する。分解は DNA 合成点附近の新生 DNA から始まり、添加後 20 分以内に細胞膜との結合が切られ、細胞質内に遊離する。この DNA は endonuclease によって添加後 30 分以内に 1 本鎖の切断が起り、90 分以内には 2 本鎖の切断が証明される。つづいてこの様に切断された DNA 断片は exonuclease によって酸可溶分画にまで分解される。

以上 NCS という酸性たん白が菌の DNA 分解を惹起する過程を分子生物学的に解明した点、本論文は学位授与に値するものと思われる。